

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : A01H 4/00		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/08262 (43) Date de publication internationale: 30 mars 1995 (30.03.95)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/01105 (22) Date de dépôt international: 21 septembre 1994 (21.09.94) (30) Données relatives à la priorité: 93/11287 22 septembre 1993 (22.09.93) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): L.V.M.H. RECHERCHE [FR/FR]; 48-50, rue de Seine, F-92700 Colombes (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): MAES, Olivier [CA/CA]; Appartement 34, 24, Central Place, Saskatoon, Saskatchewan S7N 2S2 (CA). JOUENNE, Thierry [FR/FR]; 17 b, avenue Jacques-Chastellain, F-76000 Rouen (FR). GUERN, Jean [FR/FR]; 1, avenue du Général-Leclerc, F-91190 Gif-sur-Yvette (FR). COUTOS-THEVENOT, Pierre [FR/FR]; 40, rue Mouffetard, F-75005 Paris (FR). (74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).		(81) Etats désignés: AU, JP, NZ, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Publiée Avec rapport de recherche internationale.	
(54) Title: METHOD FOR ENCOURAGING SECONDARY SOMATIC EMBRYOGENESIS AND APPLICATION TO THE REGENERATION OF PLANTS, IN PARTICULAR THE GRAPE VINE (54) Titre: PROCEDE POUR FAVORISER L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE SECONDAIRE ET APPLICATION A LA REGENERATION DE PLANTES, EN PARTICULIER DE LA VIGNE (57) Abstract A method for encouraging the production of secondary plant embryos from a culture of primary somatic embryos is characterized in that an adequate concentration of an embryogenesis-inhibiting protein is introduced into the culture medium of said primary somatic embryos for secondary embryogenesis. (57) Abrégé La présente invention concerne un procédé pour favoriser la production d'embryons végétaux secondaires à partir d'une culture d'embryons somatiques primaires, caractérisé en ce qu'on introduit dans le milieu de culture desdits embryons somatiques primaires une protéine inhibitrice de l'embryogénèse primaire en concentration efficace pour obtenir l'embryogénèse secondaire.			

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brazil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

WO 95/08262

PCT/FR94/01105

1

PROCEDE POUR FAVORISER L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE SECONDAIRE ET  
APPLICATION A LA REGENERATION DE PLANTES EN PARTICULIER DE LA VIGNE

La présente invention se rapporte à un procédé permettant de favoriser l'embryogénèse secondaire à partir d'embryons somatiques primaires en culture et à l'application de ce procédé à la régénération de plantes en particulier de la vigne.

5 Elle concerne également une plante obtenue par un procédé de régénération comprenant le procédé précité.

Pour la majeure partie des espèces végétales, la production d'embryons in natura se fait par voie sexuée ce qui a l'inconvénient, pour les espèces hétérozygotes telles que la vigne par exemple, d'entraîner une recombinaison des caractères génétiques et de perdre ainsi les caractéristiques principales des parents dont ils sont issus. Dans le cas de la vigne, les caractéristiques du cépage seraient perdues, ce qui est inacceptable en oenologie.

15 Pour permettre une multiplication clonale, c'est-à-dire à l'identique, plusieurs méthodes ont été développées, notamment in vitro. Elles peuvent aboutir à la formation d'embryons semblables à ceux issus de la fécondation des gamètes mâles et femelles, mais qui sont au niveau génétique une copie de la plante dont ils sont issus. Ces embryons sont appelés somatiques, leur production suit en général le schéma suivant :

- 20 1) induction du potentiel embryogène par des auxines exogènes, généralement en fortes concentrations, qui permettent l'apparition d'agrégats (ou masses) proembryogènes (PEM) qui correspondent à des groupes de 10 à 50 cellules, notamment méristématiques. Il arrive aussi que les embryons soient obtenus directement sur un tel milieu.
- 25 2) transfert de ces cellules sur des milieux exempts d'auxines voire à faible concentration en auxine, qui conduisent à la formation d'embryons somatiques à partir de ces PEM, en suivant les différents stades d'évolution de l'embryogénèse végétale. Ces stades d'évolution sont généralement caractérisés par une forme particulière. Ainsi dans le cas de la vigne, il est habituel de distinguer successivement les stades suivants : globule, coeur, torpille et plantule.
- 30

Ces principes sont décrits, en ce qui concerne la propagation de cellules de vigne, dans la demande de brevet US 4 532 733.

35

WO 95/08262

PCT/FR94/01105

2

Par ailleurs, il est souhaitable dans certains cas pour obtenir des plantes transgéniques, d'utiliser des embryons somatiques comme source de matériel végétal de transformation. En utilisant dans ce cas les techniques de transformation classiquement utilisées, telles que la coculture avec des agro-bactéries, ou la biolistique, on obtient des embryons dont certaines zones seulement sont transformées. La possibilité de favoriser l'embryogénèse secondaire, ou encore appelée embryogénèse adventive, à partir des zones transformées, et donc d'augmenter l'efficacité du système transformation-régénération, présente donc un intérêt évident. D'autre part, dans le cas où la transformation génétique des embryons doit être effectuée, favoriser la formation d'embryons secondaires, au niveau de l'épiderme des embryons transformés, au lieu d'un développement normal des pousses est aussi très important pour augmenter le nombre de transformants produits.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un procédé pour favoriser la production d'embryons végétaux secondaires à partir d'une culture d'embryons somatiques primaires, caractérisé en ce qu'on introduit dans le milieu de culture desdits embryons somatiques primaires une protéine inhibitrice de l'embryogénèse primaire en concentration efficace pour obtenir l'embryogénèse secondaire.

On appelle inhibition de l'embryogénèse primaire l'arrêt du développement à un stade de l'évolution de l'embryogénèse qui peut être le stade globule ou coeur ou torpille.

Plus particulièrement, le procédé selon la présente invention peut s'appliquer à la production d'embryons somatiques de vigne.

De manière générale, dans le cas des suspensions de cellules embryogènes du type 41 B, en culture dans des conditions classiques sans transfert fréquent, on observe un blocage rapide du développement au stade globule ou coeur. Certains auteurs ont avancé que ce phénomène d'inhibition était dû à la présence de macromolécules extra-cellulaires supérieures à 10 kDa (Plant Cell Tiss. Org. Cult. (1992) 29, 125-133).

La Demanderesse a trouvé de manière surprenante que certaines protéines et notamment une certaine classe de celles réputées pour inhiber l'embryogénèse primaire, permettaient de favoriser l'embryogénèse secondaire.

WO 95/08262

PCT/FR94/01105

3

Plus particulièrement, le procédé selon l'invention peut être mis en oeuvre en introduisant dans le milieu de culture des embryons primaires une fraction contenant au moins une protéine, extraite d'une culture d'embryons végétaux bloqués dans leur développement.

- 5 Selon un mode particulier de réalisation de la présente invention,
- 1) on fait une culture d'embryon de la plante considérée,
  - 2) on isole les protéines inhibitrices de l'embryogénèse, et
  - 3) on introduit ces protéines isolées dans la culture d'embryon dont on veut obtenir des embryons secondaires.

- 10 De préférence la culture dont on extrait la fraction précitée est une culture âgée d'environ 15 jours, et dont la densité initiale était élevée, par exemple de l'ordre de 1 à 2  $\mu$ l de volume d'agrégats cellulaires sédimentés (PCV) par millilitre de milieu.

- 15 Selon une variante particulière, la protéine est obtenue à partir d'une culture d'embryons végétaux appartenant à la même espèce que lesdits embryons somatiques primaires.

De préférence, la protéine est une protéine extracellulaire extraite d'un milieu de culture d'embryons végétaux.

- 20 Parmi les protéines extracellulaires convenant pour mettre en oeuvre le procédé selon l'invention, il est avantageux de choisir les protéines anioniques, éventuellement glycosylées, présentant un poids moléculaire apparent compris entre 32 kDa environ et 66 kDa environ en SDS-PAGE.

- 25 Une efficacité optimale est obtenue quand le procédé de l'invention est appliqué à des cultures effectuées, au moins partiellement, en l'absence de lumière.

De préférence, la protéine extracellulaire est introduite dans le milieu d'induction et/ou de développement des embryons.

- 30 Les embryons primaires selon une variante avantageuse sont au moins partiellement constitués de cellules transformées génétiquement, au moyen d'une technique bien connue de l'homme de l'art.

Les embryons secondaires obtenus suivant le procédé selon la présente invention peuvent être utilisés dans les procédés connus de l'homme de métier pour l'obtention de plantes régénérées.

35

W 95/08262

PCT/FR94/01105

4

Par exemple, on pourra utiliser le procédé décrit dans le document US 4 532 733, notamment colonne 3, lignes 27 à 44, comprenant le transfert des embryons dans un milieu de culture de type Murashige et Skoog (1962), supplémenté en cytokinine, telle que la benzyladénine.

5 Pour ces procédés de régénération à partir d'embryons secondaires, on pourra également se reporter à ceux décrits par G-Maheswaran et al, Ann-Bot., 57 (1988) 109-117 ou par C-S-Loh et al, New Phytol., 95 (1983) 349-358.

10 Suivant un second aspect, la présente invention a donc également pour objet une plante, en particulier une vigne, obtenue par un procédé de régénération comprenant le procédé pour favoriser la production d'embryons secondaires décrit plus haut.

Les exemples qui suivent sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée.

15

#### Exemple 1: Obtention de protéines extracellulaires d'embryogénèse primaire

##### Origine de la culture d'embryon primaire

20 On utilise comme source d'agrégats de cellules embryogènes, la culture de cellules embryogènes de porte-greffe de vigne 41 B, déposée à l'European Collection of Animal Cell Cultures sous le n° PL 92042917 décrite dans la demande internationale PCT déposée le 11 mai 1993 sous le  
25 numéro PCT/FR93/00456. Pour initier les cultures d'embryons dans un milieu dépourvu d'auxine, la suspension cellulaire est filtrée successivement sur des tamis de 500  $\mu\text{m}$  et 200  $\mu\text{m}$ , et la fraction retenue sur 200  $\mu\text{m}$  est lavée trois fois dans un milieu de culture dépourvu d'auxine, selon le protocole décrit précédemment. Les densités de population cellulaire au moment de l'inoculation déterminée par le PCV (Packed Cell  
30 Volume, unité de volume cellulaire sédimenté à 1 x g) sont comprises entre 0,05 et 1  $\mu\text{l}$  de PCV.mL<sup>-1</sup>. La correspondance PCV-densité cellulaire est assurée par des numérations faites par la méthode de dispersion dans l'acide chromique.

WO 95/08262

PCT/FR94/01105

5

### Purification des protéines extracellulaires

On réalise une culture d'embryons, comme indiqué ci-dessus, à une densité d'inoculation initiale de 1 µl de PCV par millilitre de milieu. Aucune sous-culture journalière n'est pratiquée. Après 14 jours de culture, alors que les embryons sont bloqués dans leur développement au stade globule ou coeur, comme décrit par P. Coutos-Thevenot et al. (Plant Science, (1992) 86 137-145), on extrait les protéines extracellulaires sécrétées pendant l'embryogénèse somatique. Le milieu de cette culture est clarifié par filtration sous vide à travers des filtres de particules de verre (Pyrex France) puis des membranes de fibres de verre (GF/C, Whatman) avant d'être concentré de 100 à 200 fois, en utilisant le système d'ultrafiltration Amicon équipé d'une membrane ayant un seuil de coupure de 3000 Daltons (YM 3). Le concentré est appliqué à une colonne CLHP d'échange de cations (SP-5PW, Waters) équilibrée avec un tampon phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ , 25 mM, pH 6,5) à un débit de 0,8 mL.min<sup>-1</sup>. On recueille la fraction des protéines non retenues, détectée par densité optique et suivie à 280 nm sur un détecteur UV (M440, Waters). Cette fraction de protéine non retenues (70% des protéines initiales) est réinjectée sur une colonne d'échange d'anions (DEAE-5PW, Waters) équilibrée avec un tampon TRIS (TRIS-HCl, 25 mM, pH 8,5) à 0,8 mL.min<sup>-1</sup>. La colonne est ensuite éluée en 40 minutes par un gradient linéaire de solution saline (TRIS-HCl 25 mM, NaCl 1 M, pH 8,5) de 0 à 0,3 M. Différents pics d'élution sont observés et sont recueillis dans des fractions séparées. Ces fractions sont conservées à 4° C. Les fractions protéiques sont stérilisées par filtration à 0,22 µm et leur concentration déterminée par la méthode de Lowry en utilisant de la sérum albumine bovine comme étalon. Les fractions protéiques recueillies pendant l'élution de la colonne anionique (DEAE) pendant les 25 premières minutes du gradient constituent un pic complexe avec trois épaulements pour les fractions 1 à 3, alors que les autres fractions sont recueillies sous forme de pics séparés. Au total, 8 fractions ont été recueillies.

WO 95/08262

PCT/FR94/01105

6

Pour caractériser les protéines présentes dans chaque fraction, en estimant leur masse molaire, on pratique une électrophorèse de type SDS-PAGE à voltage constant (200 V). Le gel est ensuite coloré au bleu de Coomassie ou révélé par la technique dite de Western blot avec le complexe  
5 Concanavaline A-péroxydase (Bio-rad Laboratoires, Richmond CA).

Pour chaque fraction, on observe plusieurs peptides. Il apparaît que toutes ces fractions contiennent au moins une protéine glycosylée, comme déterminé par Western blot. Les trois premières fractions apparaissent comme des mélanges complexes de peptides dans une large gamme de  
10 masses moléculaires, alors que les fractions 4 à 7 apparaissent moins complexes et composées de polypeptides différents, allant de 32 à 66 kDa.

**Exemple 2 : Production d'embryogénèse secondaire par complémentation en protéines inhibitrices de l'embryogénèse  
15 primaire**

Les masses proembryogènes inoculées à 0,1  $\mu$ l de PCV.mL<sup>-1</sup> sont complémentées au début de la culture dans un milieu exempt d'auxine avec l'une des fractions protéiques recueillies suivant l'exemple 1. Les  
20 expériences sont réalisées pour chacune des fractions dans des boîtes de microtitration de 24 puits dans 1 mL de milieu liquide et cultivées à l'obscurité sur un agitateur orbital (130 rpm) à 26° C. Pour chaque culture on effectue quatre répétitions indépendantes. Parallèlement des cultures de masse proembryogènes témoins sont réalisées dans les mêmes  
25 conditions, si ce n'est qu'au lieu d'ajouter une fraction protéique, on ajoute un volume identique de tampon CLHP, correspondant à une concentration en NaCl 0,25 M, qui est supérieure à celle nécessaire pour éluer les fractions protéiques de la colonne.

Dans des expériences préliminaires d'inhibition protéique, les  
30 fractions protéiques sont ajoutées à des concentrations allant de 1 à 100 fois leur concentration initiale trouvée dans les cultures inoculées à haute densité cellulaire et le I<sub>50</sub> (dose inhibant le développement de 50% des embryons) pour chaque fraction varie de 10 à 15  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>. Les fractions protéiques sont ensuite toutes testées à 15  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup> et leur influence sur la



WO 95/08262

PCT/FR94/01105

7

progression embryogène est mesurée après 20 jours de culture. Les embryons de chaque puits sont dénombrés. Les stades de développement pris en considération sont les stades globule, coeur, torpille et plantule. Les résultats sont rassemblés sur la figure unique annexée.

5 Sur la figure unique annexée, on a représenté, pour chaque fraction protéique testée et pour les cultures témoins, le nombre d'embryons pour chaque stade de développement pris en considération, exprimé en pourcentage par rapport au nombre total d'embryons dénombrés dans chaque puits.

10 On observe, en ce qui concerne le témoin, que 80% des embryons se sont développés jusqu'au stade torpille. Il en est environ de même pour les cultures traitées par les fractions 1, 2, 3 et 8, pour lesquelles 70 à 90% des embryons sont parvenus également au stade torpille.

15 Par contre, les résultats obtenus avec les fractions 4, 5, 6 et 7 qui contiennent des protéines de masse molaire de 32 kDa à 66 kDa, sont très sensiblement différents.

20 Pour les fractions 4 et 5, on trouve une proportion sensiblement identique, de l'ordre de 30 ou 40% d'embryons à chacun des trois stades globule, coeur et torpille. Pour la fraction 6, les embryons aux stades globule et coeur sont prépondérants. Tandis que pour la fraction 7, le nombre d'embryons parvenus au stade torpille est supérieur à celui des embryons moins développés. Toutefois, pour cette fraction, la proportion d'embryons bloqués au premier stade de développement, c'est-à-dire au stade globule est supérieure à 20 %, ce qui est très sensiblement supérieur à la proportion des embryons du même stade dénombrés pour les fractions 1, 2, 3 et 8 et pour les cultures témoins. Ainsi, il apparaît clairement que le traitement des cultures d'embryons par les fractions 4, 5, 6 et 7, entraîne une diminution très notable du nombre d'embryons développés au stade torpille et une plus forte proportion d'embryons au stade globule. On peut  
25  
30 donc en conclure que ces fractions ont provoqué l'inhibition du développement des embryons somatiques.

WO 95/08262

PCT/FR94/01105

8

On remarquera toutefois que, bien que le développement des embryons soit bloqué pour la majorité d'entre eux, une faible proportion a échappé à cette inhibition et pour laquelle les embryons ont atteint le stade de plantule.

5 Une observation microscopique de ces plantules recueillies montre que, sur l'épiderme de celles-ci, se sont formé de nombreux embryons secondaires, ou adventifs, dont le développement semble s'être arrêté au stade globulaire.

10 Ainsi, la complémentation de culture d'embryons somatiques primaires, avec des fractions extraites de cultures d'embryons dont le développement était bloqué, a permis d'obtenir la formation d'une grande quantité d'embryons secondaires, qu'il sera possible de développer ultérieurement, après transplantation dans un milieu approprié, suivant l'un des procédés bien connus de l'homme de l'art, comme décrit plus haut,  
15 pour obtenir la régénération de nouvelles plantes.

WO 95/08262

PCT/FR94/01105

### REVENDICATIONS

- 5           1. Procédé pour favoriser la production d'embryons végétaux secondaires à partir d'une culture d'embryons somatiques primaires, caractérisé en ce qu'on introduit dans le milieu de culture desdits embryons somatiques primaires une protéine inhibitrice de l'embryogénèse primaire en concentration efficace pour obtenir  
10 l'embryogénèse secondaire.
2. Procédé pour favoriser la production d'embryons végétaux secondaires à partir d'une culture d'embryons somatiques primaires, caractérisé en ce qu'on introduit dans le milieu de culture desdits embryons primaires une fraction contenant au moins une protéine,  
15 extraite d'une culture d'embryons végétaux bloqués dans leur développement.
3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que la culture dont on extrait la fraction précitée est une culture âgée d'environ 15 jours, et dont la densité initiale était élevée, par exemple de l'ordre de 1 à 2  $\mu$ l de  
20 volume d'agrégats cellulaires sédimentés (PCV) par millilitre de milieu.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la protéine précitée est obtenue à partir d'une culture d'embryons végétaux appartenant à la même espèce que lesdits embryons somatiques primaires.
- 25           5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la protéine précitée est une protéine extracellulaire extraite d'un milieu de culture d'embryons végétaux.
6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la protéine précitée est une protéine de type anionique, éventuellement  
30 glycosylée.
7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la protéine précitée présente un poids moléculaire apparent compris entre 32 kDa et 66 kDa en SDS-PAGE.

WO 95/08262

PCT/FR94/01105

10

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la protéine précitée est introduite dans le milieu d'induction et/ou de développement des embryons.

5 9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que les embryons somatiques primaires sont au moins partiellement constitués de cellules génétiquement transformées.

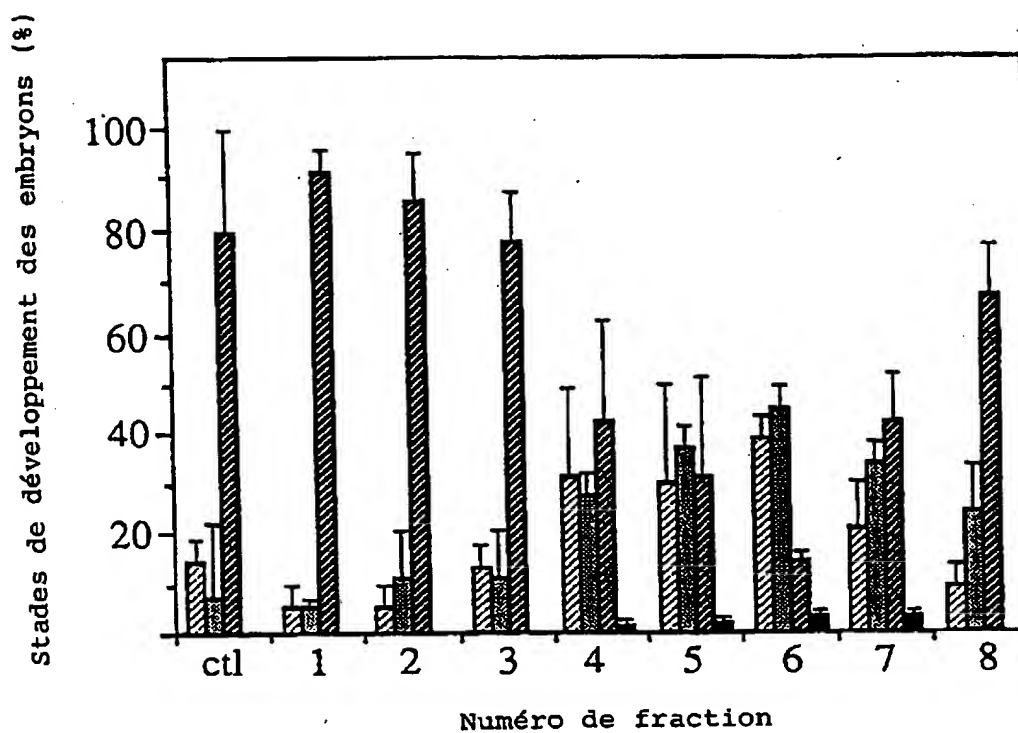
10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que la culture d'embryons primaires est une culture d'embryons de vignes.

10 11. Plante, en particulier vigne, obtenue par un procédé de régénération comprenant le procédé selon l'une des revendications 1 à 10.

WO 95/08262

PCT/FR94/01105

1/1



Stades de développement

globule



coeur



torpille



plantule



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 94/01105

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 A01H4/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PLANT CELL, TISSUE AND ORGAN CULTURE, vol.9, no.1, 1987, DORDRECHT, NL pages 73 - 80 D.J. GRAY ET AL. 'Initiation and maintenance of long term somatic embryogenesis from anthers and ovaries of Vitis longii ' see the whole document ---	1,10
A	IN VITRO, vol.29A, no.3, March 1993 page 63A L.C. MARTINELLI ET AL. 'A study for the characterization of somatic embryogenesis on grapevine ' see the whole document --- -/--	1,10

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 November 1994

Date of mailing of the international search report

14.12.94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Merckx, A

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. mal Application No  
PCT/FR 94/01105

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PLANT SCIENCE, vol.86, 1992 pages 137 - 145 P. COUTOS-THEVENOT ET AL. 'Extracellular protein patterns of grapevine cell suspensions in embryogenic and non-embryogenic situations' cited in the application see abstract	1,10
A	ANNALS OF BOTANY, vol.57, 1986 pages 109 - 117 G. MAHESWARAN ET AL. 'Direct secondary somatic embryogenesis from immature sexual embryos of Trifolium repens cultured in vitro' cited in the application * 'Discussion' *	1
A	THE NEW PHYTOLOGIST, vol.95, 1983 pages 349 - 358 C.-S. LOH ET AL. 'Cytokinins and the regeneration of plantlets from secondary embryoids of winter oilseed rape, Brassica napus ssp. oleifera' cited in the application * 'Discussion' *	1
A	EP,A,0 293 598 (DNA PLANT TECHNOLOGY CORPORATION ET AL.) 7 December 1988	
A	US,A,4 532 733 (W.R. KRUL) 6 August 1985 cited in the application	
A	PLANT CELL, TISSUE AND ORGAN CULTURE, vol.29, 1992 pages 125 - 133 P. COUTOS-THEVENOT ET AL. 'Somatic embryogenesis from grapevine cell. I - Improvement of embryo development by changes in culture conditions' cited in the application	
A	WO,A,87 02701 (PLANT GENETICS, INC.) 7 May 1987	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Application No  
PCT/FR 94/01105

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0293598	07-12-88	JP-A- 1010922 US-A- 5312801 ZA-A- 8803078	13-01-89 17-05-94 08-11-88
US-A-4532733	06-08-85	DE-A- 3343894 FR-A,B 2537157 US-A- 4714679	07-06-84 08-06-84 22-12-87
WO-A-8702701	07-05-87	AU-A- 6521986 EP-A- 0243469 JP-T- 63501263	19-05-87 04-11-87 19-05-88



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema Internationale No  
PCT/FR 94/01105

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 A01H4/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 6 A01H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	PLANT CELL, TISSUE AND ORGAN CULTURE, vol.9, no.1, 1987, DORDRECHT, NL pages 73 - 80 D.J. GRAY ET AL. 'Initiation and maintenance of long term somatic embryogenesis from anthers and ovaries of Vitis longii ' voir le document en entier ---	1,10
A	IN VITRO, vol.29A, no.3, Mars 1993 page 63A L.C. MARTINELLI ET AL. 'A study for the characterization of somatic embryogenesis on grapevine' voir le document en entier --- -/--	1,10

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 Novembre 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

14.12.94

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Merckx, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No  
PCT/FR 94/01105

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	PLANT SCIENCE, vol.86, 1992 pages 137 - 145 P. COUTOS-THEVENOT ET AL. 'Extracellular protein patterns of grapevine cell suspensions in embryogenic and non-embryogenic situations' cité dans la demande voir abrégé ---	1,10
A	ANNALS OF BOTANY, vol.57, 1986 pages 109 - 117 G. MAHESWARAN ET AL. 'Direct secondary somatic embryogenesis from immature sexual embryos of Trifolium repens cultured in vitro' cité dans la demande * 'Discussion' * ----	1
A	THE NEW PHYTOLOGIST, vol.95, 1983 pages 349 - 358 C.-S- LOH ET AL. 'Cytokinins and the regeneration of plantlets from secondary embryoids of winter oilseed rape, Brassica napus ssp. oleifera' cité dans la demande * 'Discussion' * ----	1
A	EP,A,0 293 598 (DNA PLANT TECHNOLOGY CORPORATION ET AL.) 7 Décembre 1988 ----	
A	US,A,4 532 733 (W.R. KRUL) 6 Août 1985 cité dans la demande ----	
A	PLANT CELL, TISSUE AND ORGAN CULTURE, vol.29, 1992 pages 125 - 133 P. COUTOS-THEVENOT ET AL. 'Somatic embryogenesis from grapevine cell. I - Improvement of embryo development by changes in culture conditions' cité dans la demande ----	
A	WO,A,87 02701 (PLANT GENETICS, INC.) 7 Mai 1987 -----	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Den c Internationale No  
PCT/FR 94/01105

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0293598	07-12-88	JP-A- 1010922	13-01-89
		US-A- 5312801	17-05-94
		ZA-A- 8803078	08-11-88
US-A-4532733	06-08-85	DE-A- 3343894	07-06-84
		FR-A,B 2537157	08-06-84
		US-A- 4714679	22-12-87
WO-A-8702701	07-05-87	AU-A- 6521986	19-05-87
		EP-A- 0243469	04-11-87
		JP-T- 63501263	19-05-88



# Intellectual Property Network

To Search & Research

[Home](#) | [Search](#) | [Order](#) | [Shopping Cart](#) | [Login](#) | [Site Map](#) | [Help](#)



## EP720425B1: METHOD FOR ENCOURAGING SECONDARY SOMATIC EMBRYOGENESIS AND APPLICATION TO THE REGENERATION OF PLANTS, IN PARTICULAR THE GRAPE VINE

[View Images \(7 pages\)](#) | [View Cart](#) | [View INPADOC only](#)

Add to cart: [PDF \(~665 KB\)](#) | [TIFF](#) | [Fax](#) | [File History](#) | [More choices...](#)

Country: **EP** European Patent Office (EPO)

Kind: **B1** Patent

Inventor(s): **MAES, Olivier**  
**JOUENNE, Thierry**  
**GUERN, Jean**  
**COUTOS-THEVENOT, Pierre**

Applicant(s): **L.V.M.H. RECHERCHE**  
[News, Profiles, Stocks and More about this company](#)

Issued/Filed Dates: **Feb. 25, 1998 / Sept. 21, 1994**

Application Number: **EP1994000928425**

IPC Class: **A01H 4/00;**

Priority Number(s): **Sept. 22, 1993 FR1993000011287**

Legal Status:  [Show legal status actions](#)

Designated Countries: **BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, NL, PT**  
Attorney, Agent, or Firm: **Ahner, Francis et al;**  
Family:

Patent	Issued	Filed	Title
<a href="#">WO9508262A1</a>	March 30, 1995	Sept. 21, 1994	METHOD FOR ENCOURAGING SECONDARY SOMATIC EMBRYOGENESIS AND APPLICATION TO THE REGENERATION OF PLANTS, IN PARTICULAR THE GRAPE VINE
<a href="#">USW1508262</a>	March 30, 1995		
<a href="#">PT720425R4</a>	Feb. 25, 1998		
<a href="#">PT720425R1</a>	July 10, 1996		

NZ9508262W1	March 30, 1995		
NZ273969A	Dec. 19, 1997	Sept. 21, 1994	METHOD OF ENHANCING SECONDARY SOMATIC EMBRYOGENESIS OVER PRIMARY SOMATIC EMBRYOGENESIS, REGENERATION OF PLANTS; GRAPEVINES
NL720425R4	Feb. 25, 1998		
NL720425R1	July 10, 1996		
LI720425R4	Feb. 25, 1998		
LI720425R1	July 10, 1996		
JP9508262W1	March 30, 1995		
JP9504688T2	May 13, 1997	Sept. 21, 1994	
IT720425R4	Feb. 25, 1998		
IT720425R1	July 10, 1996		
GR720425R4	Feb. 25, 1998		
GR720425R1	July 10, 1996		
GB720425R4	Feb. 25, 1998		
GB720425R1	July 10, 1996		
FR2710233B1	Dec. 15, 1995	Sept. 22, 1993	PROCEDE POUR FAVORISER L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE SECONDAIRE ET APPLICATION A LA REGENERATION DE PLANTES EN PARTICULIER DE LA VIGNE.
FR2710233A1	March 31, 1995	Sept. 22, 1993	PROCEDE POUR FAVORISER L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE SECONDAIRE ET APPLICATION A LA REGENERATION DE PLANTES EN PARTICULIER DE LA VIGNE.
FR720425R4	Feb. 25, 1998		
FR720425R1	July 10, 1996		
ES2114228T3	May 16, 1998	Sept. 21, 1994	PROCEDIMIENTO PARA FAVORECER LA EMBRIOGENESIS SOMATICA SECUNDARIA Y APLICACION A LA REGENERACION DE PLANTAS, EN PARTICULAR DE LA VID.
ES720425R4	Feb. 25, 1998		
ES720425R1	July 10, 1996		
EP9508262W1	March 30, 1995		
EP720425B1	Feb. 25, 1998	Sept. 21, 1994	METHOD FOR ENCOURAGING SECONDARY SOMATIC EMBRYOGENESIS AND APPLICATION TO THE REGENERATION OF PLANTS, IN PARTICULAR THE GRAPE VINE
			METHOD FOR ENCOURAGING SECONDARY SOMATIC

<u>EP720425A1</u>	July 10, 1996	Sept. 21, 1994	EMBRYOGENESIS AND APPLICATION TO THE REGENERATION OF PLANTS, IN PARTICULAR THE GRAPE VINE
<u>DK720425R4</u>	Feb. 25, 1998		
<u>DK720425R1</u>	July 10, 1996		
<u>DE69408681T2</u>	Oct. 1, 1998	Sept. 21, 1994	VERFAHREN ZUR FOERDERUNG DER SEKUNDAEREN SOMATISCHEN EMBRYOGENESE UND ANWENDUNG ZUR PFLANZENREGENERATION, INSBESONDERE DER WEINREBE
<u>DE69408681C0</u>	April 2, 1998	Sept. 21, 1994	VERFAHREN ZUR FOERDERUNG DER SEKUNDAEREN SOMATISCHEN EMBRYOGENESE UND ANWENDUNG ZUR PFLANZENREGENERATION, INSBESONDERE DER WEINREBE
<u>DE720425R4</u>	Feb. 25, 1998		
<u>DE720425R1</u>	July 10, 1996		
<u>CH720425R4</u>	Feb. 25, 1998		
<u>CH720425R1</u>	July 10, 1996		
<u>BE720425R4</u>	Feb. 25, 1998		
<u>BE720425R1</u>	July 10, 1996		
<u>AU9508262W1</u>	March 30, 1995		
<u>AU7785794A1</u>	April 10, 1995	Sept. 21, 1994	METHOD FOR ENCOURAGING SECONDARY SOMATIC EMBRYOGENESIS AND APPLICATION TO THE REGENERATION OF PLANTS, IN PARTICULAR THE GRAPE VINE
<u>AU687446B2</u>	Feb. 26, 1998	Sept. 21, 1994	METHOD FOR ENCOURAGING SECONDARY SOMATIC EMBRYOGENESIS AND APPLICATION TO THE REGENERATION OF PLANTS, IN PARTICULAR THE GRAPE VINE
41 family members shown above			

Other Abstract Info:

DERABS C95-139330

Foreign References:

(No patents reference this one)

Powered by **DB2**  
and **NetData**

Nominate this  
invention  
for the Gallery...

Alternative  
Searches
  
Patent Number

  
Boolean Text

  
Advanced Text

Brows

  
U.S. Class  
by title

  
U.S. Class  
by number



[Privacy](#) | [Legal](#) | [Gallery](#) | [IP Pages](#) | [Advertising](#) | [FAQ](#) | [Contact Us](#)



TO: Mary Jane McKay-Carey  
McKay-Carey & Company  
Edmonton

FROM: Francois Eudes  
Research Centre  
5403 - 1st Avenue South  
P. O. Box 3000  
Lethbridge, AB, Canada T1J 4B1

FACSIMILE NO.: 1 (780) 421 0834

Facsimile No.: (403) 382-3156  
Telephone No.: (403) 327-4561

NO. OF PAGES: 19

DATE: 16 August 2000

**WARNING: THIS MESSAGE IS INTENDED ONLY FOR THE USE OF THE ADDRESSEE AND MAY CONTAIN INFORMATION THAT IS PRIVILEGED AND CONFIDENTIAL. If you are not the intended recipient, you are hereby notified that any dissemination of this communication is strictly prohibited. If you have received this communication in error, please notify us immediately by telephone. Thank you.**

Hi Mary Jane,

Please find the patent X/O 95/08262, which  
mention "primary embryo" and "secondary embryo".

Thanks

Francois Eudes.